



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE GERANIO ROJO
(*Pelargonium zonale*) MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN
DE HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA (*Naja naja*).”**

Trabajo de titulación previo a la obtención de grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: CARLOS AUGUSTO ANDRADE GAIBOR

**Riobamba – Ecuador
2015**



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE GERANIO ROJO (*Pelargonium
zonale*) MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN DE
HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA (*Naja naja*).”**

Trabajo de titulación previo a la obtención de grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**AUTOR: CARLOS AUGUSTO ANDRADE GAIBOR
TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA M.SC.**

**Riobamba – Ecuador
2015**

DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Carlos Augusto Andrade Gaibor, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en los documentos que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 8 de Enero del 2016

Carlos Augusto Andrade Gaibor

060424120-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE GERANIO ROJO** (*Pelargonium zonale*) **MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* DE INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA Y VENENO DE COBRA** (*Naja naja*).”, de responsabilidad del señor egresado Carlos Augusto Andrade Gaibor, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

Lcda. Karen Acosta León M. Sc.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Yo, (Carlos Augusto Andrade Gaibor), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CARLOS AUGUSTO ANDRADE GAIBOR

DEDICATORIA

A mi abuelito Papa Cesitar, que en paz descansa.

Carlos.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme sabiduría, vida y haberme proporcionado la enorme satisfacción de culminar mi carrera universitaria.

A nuestra Institución la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por los conocimientos adquiridos.

A mis Padres por ayudarme en cada instante y darme su apoyo en el desarrollo de mi carrera estudiantil.

Igualmente es de gran importancia el apoyo del BQF. Diego Vinueza por su cooperación, buena vibra y asesoramiento en la elaboración de este trabajo de investigación.

Carlos.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	VII
SUMMARY	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1.1. <i>Complicaciones Crónicas de la Diabetes</i>	3
1.1.1.1. <i>Retinopatías Diabéticas</i>	4
1.1.1.2. <i>Hipertensión Arterial</i>	4
1.1.1.3. <i>Pie diabético</i>	4
1.2. CICATRIZACIÓN	5
1.2.1. <i>Fases de la cicatrización</i>	5
1.2.1.1. <i>Hemostasia</i>	5
1.2.1.2. <i>Fase Inflamatoria</i>	5
1.2.1.3. <i>Fase de proliferación</i>	6
1.2.1.4. <i>Fase de remodelación</i>	6
1.3. PELARGONIUM ZONALE	7
1.3.1. <i>Generalidades de la Planta</i>	7
1.3.2. <i>Metabolitos asociados</i>	7
1.4. HIALURONIDASA (EC 3.2.1.35)	9
1.5. VENENO DE COBRA (NAJA NAJA)	11
CAPITULO II	12
2. MARCO METODOLÓGICO.....	12
2.1. PARTE EXPERIMENTAL	12
2.1.1. <i>Sitio De Investigación</i>	12
2.1.2. <i>Materia Prima</i>	12

2.1.3.	<i>Materiales, reactivos y equipos</i>	12
2.1.3.1.	<i>Materiales</i>	12
2.1.3.2.	<i>Equipos</i>	13
2.1.3.3.	<i>Reactivos</i>	14
2.2.	TÉCNICAS.	15
2.2.1.	<i>Control de calidad de la materia prima</i>	15
2.2.1.1.	<i>Determinación de Humedad</i>	15
2.2.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	15
2.2.2.	<i>Ensayo fitoquímico</i>	16
2.2.2.1.	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	17
2.2.2.2.	<i>Ensayo de Mayer</i>	17
2.2.2.3.	<i>Ensayo de Wagner</i>	17
2.2.2.4.	<i>Ensayo de Lieberman- Buchard</i>	17
2.2.2.5.	<i>Ensayo de Baljet</i>	17
2.2.2.6.	<i>Ensayo de Sudán III</i>	17
2.2.2.7.	<i>Ensayo de Borntrager</i>	17
2.2.2.8.	<i>Ensayo de catequina</i>	18
2.2.2.9.	<i>Ensayo de saponinas</i>	18
2.2.2.10.	<i>Ensayo de cloruro férrico</i>	18
2.2.2.11.	<i>Ensayo de Shinoda</i>	18
2.2.3.	<i>Preparación de los extractos de Pelargonium zonale de hojas y flores</i>	18
2.2.4.	<i>Determinación de la inhibición de hialuronidasa</i>	21
2.2.4.1.	<i>Inhibición de hialuronidasa</i>	21
2.2.4.2.	<i>Veneno de Cobra (Naja naja)</i>	22

CAPITULO III..... 24

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... 24

3.1.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.	24
3.1.1.	<i>Control de Calidad de la Materia Prima.</i>	24
3.1.2.	<i>Tamizaje Fitoquímico.</i>	25
3.1.3.	<i>Cromatografía en Capa Fina</i>	26
3.1.3.1.	<i>Cromatografías del extracto de Pelargonium zonale.</i>	26
3.1.3.2.	<i>Cromatografías del extracto de Pelargonium zonale (flores)</i>	27

3.1.4.	<i>Cuantificación de Flavonoides Totales.</i>	27
3.1.5.	<i>Análisis del Protocolo de inhibición de la Hialuronidasa.</i>	28
CONCLUSIONES.....		32
RECOMENDACIONES.....		33

INDICE DE ABREVIATURAS

G	Gramos
mL	Mililitros
%	Porcentaje
S	Segundo
N	Normalidad
dL	Decilitro
M	Moralidad
°C	Grados celsius
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
OMS	Organización Mundial de la Salud
α	Alfa
P.z	<i>Pelargoniumzonale</i>
β	Beta
mM	Milimol
km	Kilometro
mg	Miligramos
MSP	Ministerio de Salud Pública
ug	Microgramo
uL	Microlitro
INEN	Instituto Nacional de Normas Ecuatorianas

INDICE DE TABLAS

TABLA N°1-2	Esquema de tratamientos de acuerdo a cada parte de la especie vegetal para la inhibición de hialuronidasa.....	21-22
TABLA N°2-2	Esquema de tratamientos de acuerdo a cada parte de la especie vegetal en la inhibición del veneno de cobra (<i>Naja naja</i>).....	23
TABLA N°1-3	Control de calidad de la planta investigada.....	24
TABLA N°2-3	Tamizaje Fitoquímico de los extractos de <i>Pelargonium zonale</i> de hojas y flores.....	25
TABLA N°3-3	Porcentaje de inhibición de hialuronidasa de los extractos metanólicos de <i>Pelargonium zonale</i> de hojas y flores.....	26
TABLA N°4-3	Efecto de los extractos metanólicos de <i>Pelargonium zonale</i> en hojas y flores en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra.....	27

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°1-3	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del <i>Pelargonium zonale</i> (hojas).....	26
CUADRO N°2-3	Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de <i>Pelargonium zonale</i> (flores).....	27

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1-1	Fórmula del ácido hialurónico.....	11
FIGURA N°1-2	Diagrama de obtención de metabolitos secundarios.....	16
FIGURA N°2-2	Diagrama de flujo para la obtención de extracto de <i>Pelargoniumzonale</i> (Flores).....	19
FIGURA N°3-2	Diagrama de flujo para obtención de extractos de <i>Pelargoniumzonale</i> (hojas).....	20
FIGURA N°1-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>Pelargoniumzonale</i> (hojas). Fase Móvil: tolueno: acetato de etilo forma progresiva (93:7)-(80:20)-(70:30)-(60:40).....	26
FIGURA N°2-3	Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de <i>Pelargoniumzonale</i> (flores). Fase Móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26).....	27
FIGURA N°3-3	Curva de calibración de quercetina.....	28
FIGURA N°3-3	Curva de Calibración de la actividad de los extractos metanólicos de <i>Pelargoniumzonale</i> hojas y flores en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra (<i>Naja naja</i>).....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A

Análisis de Humedad

ANEXO B

Obtención de los extractos de la planta

ANEXO C

Inhibición de hialuronidasa

ANEXO D

Determinación de absorbancias de los diferentes
tratamientos

RESUMEN

Se determinó el efecto cicatrizante del Geranio Rojo (*Pelargonium zonale*), mediante ensayos *in vitro* de inhibición de hialuronidasa y veneno de cobra (*Naja naja*), estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Fitofarmacia y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En el cual se utilizó diferentes concentraciones de la parte flavónica de la planta (hojas y flores) estos fueron: 0.005 g/mL - 0.01 g/mL y 0.02 g/mL. Se utilizó un blanco negativo y un control el cual nos indicará la mayor actividad de los ensayos realizados. Los extractos obtenidos se los realizó mediante macerado y reflujo a partir de 50 gramos de hojas y flores secas de la planta en estudio. Los resultados que se obtuvieron en la inhibición de hialuronidasa fueron satisfactorios en los tratamientos con *Pelargonium zonale* con un 80.3% de inhibición en la dosis de 0.02 g/mL de los extractos de hojas y flores. En los resultados obtenidos en la inhibición de veneno de cobra los tratamientos fueron de la misma manera efectivos comprobando el efecto que tiene la planta para cicatrizar, se recomienda continuar con los estudios de la planta utilizando más concentraciones de la parte flavónica de *Pelargonium zonale*, por lo menos 6 concentraciones más altas de las empleadas en este estudio.

Palabras claves: <INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA *IN VITRO*><INHIBICIÓN DE VENENO DE COBRA *IN VITRO*><*PELARGONIUM ZONALE*><PIE DIABÉTICO><CICATRIZACIÓN><FLAVONOIDES>

ABSTRACT

The healing effect of red geranium (*Pelargonium zonale*) is determined by inhibition of hyaluronidase *in vitro* and cobra venom (*Naja naja*), these tests were performed at the Laboratory of Phytopharmacy and Instrumental Analysis of the Science Faculty of the Higher School Polytechnic of Chimborazo. In which different concentrations of flavonic part of the plant (leaves and flowers) were used, such as: 0.005 g/mL – 0.01 g/mL and 0.02 g/mL. White and negative control which will indicate the main activity of the trials is used. The extracts obtained are performed by the ebb and macerated from 50 grams of dried leaves and flowers of the plant under study. The results obtained in inhibiting hyaluronidase were satisfactory treatments with *Pelargonium zonale* in 80.3% inhibition at doses of 0.02 g/mL of the extracts of leaves and flowers. In the results in the inhibition of cobra venom treatments were very effective way of checking the effect of the plant to heal, it is recommended to continue studies of the plant using more flavonic concentrations of *Pelargonium zonale*, for at least 6 concentrations higher than those used in this study.

KEYWORDS: <INHIBITION OF HYALURONIDASE *IN VITRO*><INHIBITION OF COBRA VENOM *IN VITRO*><PELARGONIUM ZONALE><DIABETIC FOOT><WOUND HEALING><FLAVONOIDS>

INTRODUCCIÓN

La fitoterapia o también denominado tratamiento con las plantas medicinales esta recibiendo más aceptación en los diferentes estratos sociales alcanzando un auge que nadie imaginaba a pesar de tener una larga historia de saber popular, ha sido menospreciada por los profesionales de la salud. (“USO MEDICINAL DE LAS PLANTAS.pdf,” n.d.)

Este tipo de alternativa de origen natural constituye en países en vías de desarrollo un recurso muy valioso, aunque no se conoce exactamente la extensión en la cual se utiliza a nivel global, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dispuesto una cifra, que cerca del 80% de la población mundial utiliza plantas como medicina natural, siendo usado los extractos o sus principios activos en tratamientos en su mayor parte efectivos. (Akerlele, O. 1985. p. 1)

La información científica que existe sobre el empleo de las plantas medicinales hoy en día es muy numerosa, y el constante aumento en el número de plantas conocidas e investigadas obligan a que el profesional de la salud tenga un conocimiento serio y objetivo sobre la utilidad real de las plantas. (“USO MEDICINAL DE LAS PLANTAS.pdf,” n.d.)

Dentro de las enfermedades crónicas que se encuentran en el Ecuador la Diabetes mellitus ha representado un problema de salud en la actualidad, siendo la primera causa de muerte en el país obteniéndose un registro de 4.695 muertes, con un porcentaje de 7,44% y una tasa de mortalidad de 29,76. (INEN, 2013. <http://ecuadorencifras.com>)

La diabetes afecta en todo el mundo a gran número de personas de cualquier estrato social. Esta enfermedad representa un gran problema personal y de salud pública de grandes proporciones que sigue que sigue agudizándose pese a los interesantes adelantos de los últimos años en casi todos los campos de investigación y en la atención de los pacientes. (Serie de informes técnicos 727, 1985)

El gasto usado en medicamentos para la diabetes se ha duplicado en los últimos años, debido a un claro desplazamiento y preferencia de la prescripción hacia los nuevos fármacos, hecho que podemos decir responde más a una estrategia de marketing que a una ventaja clínica reales. (Tamayo, M. 2014. p. 25)

Una de las complicaciones de la diabetes mellitus es el pie diabético, este engloba un conjunto de síndromes en los que la presencia de neuropatía, isquemia e infección producen lesiones tisulares o

úlceras debido a pequeños traumatismos, produciendo una importante morbilidad que puede llegar incluso a amputaciones. (Venezuela, 2012)

Es menester encontrar nuevas alternativas en las plantas que faciliten el proceso de cicatrización en pacientes que padecen de pie diabético o cualquier otra herida, pero lo ideal sería que sean asequibles a todos los consumidores, en el Ecuador encontramos un fármaco la trolamina el cual se emplea en el tratamiento terapéutico de la cicatrización del pie diabético, este es muy efectivo, pero su precio es el problema, no es asequible para todos los seres vivos que padecen de esta enfermedad. De igual forma ocurre con el factor de crecimiento epidérmico recombinante denominado Heberprot-P®, este fármaco permite un mejor progreso en el tratamiento de pie diabético, pero su costo es igual elevado llegando alcanzar un valor de 6.857,35 dólares. (MSP. 2013. <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes.html>)

Es así, que se opta por emplear especies vegetales como alternativa de tipo natural como el *Pelargonium zonale*, ya que dichos componentes (metabolitos secundarios), como: compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas entre otros; permiten la regeneración de las células y por ende la inhibición de compuestos que no permiten cicatrización en personas que padecen heridas y pie diabético.

La inhibición de la enzima hialuronidasa nos permite obtener un método confiable y preciso, y a parte de ello nos regala una gran ventaja para los amantes de los animales ya que no se lleva a cabo la muerte del animal de experimentación al ser este un método *in vitro*. (Prathiba, V., Gupta, P.D. 2000. p. 78)

Este tipo de investigación a parte de darnos un tratamiento de bajo costo que puede salvar vidas antes de producirse necrosis o amputamiento, también nos muestra un precedente en el desarrollo de nuevas y mejoradas investigaciones nacionales ya que la diabetes mellitus es una enfermedad que en nuestro país cada vez crece y es la que tiene a su haber la mayor tasa de mortalidad en el Ecuador. (MSP. <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes.html>)

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Diabetes

La Diabetes Mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, esto se da por defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La hiperglucemia crónica puede a largo plazo causar daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

Cuando los niveles de glucosa 70-110 mg/dL en sangre se encuentran por encima de estos valores normales (hiperglucemia), se genera la diabetes, esto se debe a que la hormona insulina provoca un fallo incrementando los niveles de glucosa en la sangre. (Balkan, B. 1991. p. 40)

CLASIFICACION

Diabetes Mellitus tipo 1: Caracterizada por una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes).

Diabetes Mellitus tipo 2: Caracterizada por insulino-resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Con niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglicemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control, pero ella no es indispensable para preservar la vida (insulino-requientes).(La, Mellitus, En, Gestacional, & Intolerancia, 1997)

1.1.1. Complicaciones Crónicas de la Diabetes

Entre las complicaciones más graves de la Diabetes tenemos:

- Retinopatías Diabética.
- Hipertensión Arterial.
- Pie Diabético.

1.1.1.1. Retinopatías Diabéticas.

Esta complicación crónica está directamente relacionada con el daño que hace la hiperglucemia, especialmente en los capilares que posee la retina. Los pericitosretinales son los que primero se ven afectados, ya que se acumula sorbitol, estos pierden la capacidad contráctil, y posteriormente mueren. (Sistemas, 1940)

1.1.1.2. Hipertensión Arterial

Se da por rigidez de las paredes de los vasos sanguíneos esta se produce debido a la acumulación de glucosa, logrando que la circulación en el torrente sanguíneo sea mucho más forzada, esto causa que la presión sanguínea aumente provocando la hipertensión, también esto puede ser acompañado de otros factores como malos hábitos alimenticios, sedentarismo, entre otros. (Tamayo, M. 2014, p. 25)

1.1.1.3. Pie diabético

Se produce un pie diabético cuando existe un daño en los tejidos como consecuencia de la diabetes, provocando la úlcera en las extremidades inferiores llevando a infecciones, necrosis y en el peor de los casos el amputamiento de la parte afectada. Se incluye una hiperqueratosis provocando daño óseo a nivel del talón, originando una necrosis sin el debido cuidado, todo ello a la dificultad en el proceso de cicatrización en pacientes diabéticos.

Determinación del grado de riesgo en las lesiones del pie diabético

El interés básico en disponer de una clasificación clínica de los estadios en que cursa el pie diabético responde a la conveniencia de articular los protocolos terapéuticos adecuados a la necesidad de establecer su valor predictivo en cuanto a la cicatrización de la úlcera. La clasificación de Wagner (Meggett/Wagner) valora 3 parámetros: la profundidad de la úlcera, el grado de infección y el grado de necrosis. Existen los siguientes grados:

- Grado 0: no hay lesión; pie de alto riesgo.
- Grado 1: úlcera superficial que compromete todo el espesor de la piel, pero no los tejidos subyacentes.
- Grado 2: úlcera profunda, que penetra hasta ligamentos y músculos, pero no compromete el hueso ni la formación de abscesos.
- Grado 3: úlcera profunda complicada con celulitis o formación de abscesos, casi siempre con osteomielitis.
- Grado 4: gangrena localizada.

- Grado 5: gangrena extensa que compromete todo el pie.(Triana Ricci, 2015)

1.2. Cicatrización

El proceso de cicatrización es una secuencia de procesos que depende de la dinámica celular del tejido celular lesionado y circundante. Estas células permiten la liberación de factores de crecimiento y citocinas para llevar a cabo la reparación en tres fases: aguda o inflamatoria, proliferación celular y remodelación tisular. (Valencia, 2010)

1.2.1. Fases de la cicatrización

Este proceso consta de 3 fases:

- Hemostasia (fase aguda)
- Fase inflamatoria
- Fase de proliferación (o fase fibroblástica)
- Fase de remodelación (o fase de maduración)

1.2.1.1. Hemostasia

Cuando se produce lesión tisular ya sea un corte o una herida se origina un daño a nivel de los vasos sanguíneos seguido de la pérdida de células, plasma y factores de intersticio. En esta fase intervienen los elementos celulares sanguíneos los cuales dan inicio a la coagulación por lo tanto se forma el tapón hemostático, donde actúan la cascada de los factores de coagulación y agregación plaquetaria. (Kirsner, R., Eaglstein, W. 1993. p. 653)

1.2.1.2. Fase Inflamatoria

Aquí las células inmunológicas como lo son los neutrófilos migran hacia la herida, estos son llevados por mecanismos quimiotácticos, como el factor que estimula a los granulocitos, macrófagos, entre otros, así llegando al aumento del complejo dimérico, facilitando a su vez la diapedesis. (Larjava, H., et al. 1993. p. 92)

Se da una fagocitosis de microorganismos que estén presentes en la herida, a través de enzimas específicas y radicales libres de oxígeno, en donde algunos neutrófilos se disecan con el tapón hemostático y otros simplemente mueren. (Xu, J., Clark, R. 1996. p. 239)

Por último, los monocitos se transforman en macrófagos uniéndose a proteínas que se encuentran en la matriz extracelular, esto da origen a la fagocitosis. (Vaalamo, M., et al. 1997. p. 109)

1.2.1.3. Fase de proliferación

En esta los fibroblastos son los que se encargan de la producción de la matriz dérmica, con esto pueden llegar a la herida desde músculo, tendón, transportándose hacia la matriz laxa de fibronectina.

La falta de oxígeno en la herida permite que se libere los factores de crecimiento los cuales estimulan la proliferación de dichos fibroblastos. (Detmar, M., et al. 1997. p. 108)

La matriz de colágeno se forma con la migración de los fibroblastos los cuales depositan fibronectina y ácido hialurónico. (Clark, R.A.F., et al. 1990. pp. 128-134)

Intervienen células periendotheliales e integrinas las cuales ayudan en la estabilidad y formación de nuevos vasos sanguíneos. (Folkman, J. 1997. p. 79)

1.2.1.4. Fase de remodelación

O también denominada fase de maduración en donde la fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno producidos por el fibroblasto actúan y se da la reparación de la misma, además de ser soporte tisular, tanto el ácido hialurónico como la fibronectina son degradados por enzimas. (Toole, BP. 1991. p. 305). Finalmente, la actividad celular se ve disminuida, tronándose el tejido conjuntivo rico en colágeno. La dermis alcanza un 70% de reparación de la lesión. (Machesney, M., et al. 1998. p. 152)

1.3. *Pelargoniumzonale*

1.3.1. *Generalidades de la Planta*

Taxonomía

Nombre común: Geranio

Nombre científico: *Pelargoniumzonale*

Familia: Geraniaceae

Descripción botánica: Planta herbácea, perenne, de 30 – 50cm de altura. Tallo erecto con hojas alternas, simples, aromáticas, margen lobular. Según su nervadura es palmada y su base foliar es cordada. Las flores están en umbela, pueden ser simples o dobles, son vistosas y aromáticas, el cáliz posee 5 sépalos libres; la corola 5 pétalos libres, de 10 – 15 estambres (no todos fértiles) y un ovario súpero.

Distribución: Se trata de una planta introducida, originaria de Sudáfrica. A veces se les encuentra en estado semisilvestre. La familia Geraniaceae, comprende alrededor de 700 especies, son hierbas y arbustos; se usan con fines ornamentales y medicinales.

Cultivo: Se cultivan en parcelas de suelo y macetas, necesitan de luz abundante y de un terreno bien drenado. Florecen prácticamente todo el año. Son tolerantes al calor y heladas de menor importancia, pero lo adecuado es colocarles en lugares protegidos para un desarrollo mejor de la planta.

Usos medicinales: Las hojas de *Pelargoniumzonale* son utilizadas en casos de inflamación de la garganta, diarrea, hemorragia, dolor de muela. Otros usos: ornamental y como insecticida, para eliminar pulgas. Su forma de preparación es en infusión, se recomienda gárgaras para inflamaciones de la garganta. En caso de dolor se aplica las hojas molidas en la zona afectada.

1.3.2. *Metabolitos asociados*

- **Compuestos fenólicos (CF):** Por lo general, los vegetales como producto de su metabolismo secundario normal son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.) Los fenoles se caracterizan por ser solubles ya que tienen carácter ácido, además tienen la capacidad de formar complejos y dan positivo el test del cloruro férrico. Generalmente son poco tóxicas por lo que no se suele exigir la valoración de estas sustancias. Dentro de las acciones terapéuticas se le atribuye propiedades como diuréticas, antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, astringentes, antipiréticas, anti radical, antirreumático
- **Taninos (TA):** Los taninos son compuestos polifenólicos, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina), debido a sus propiedades de curtir la piel y su poder astringente. Los taninos son solubles en agua y disolventes orgánicos polares (acetona, alcohol) pero insoluble en disolvente orgánicos apolares (cloroformo, éter), pueden formar complejos con metales pesados y se oxidan con facilidad, sobre todo en medio ácido. Como acciones terapéuticas se consideran las siguientes: *f* Antídoto: Debido a su capacidad de formar complejos con metales pesados y alcaloides es utilizado como antídoto en este tipo de intoxicación. *f* Astringentes: Debido a su capacidad para precipitar proteínas de la piel, proteínas salivares, etc. Se suelen utilizar como cicatrizantes por vía externa. *f* Antisépticos: tienen una acción bactericida y bacteriostática. También ejercen un efecto anti fúngico. *f* Protectores: los taninos aplicados en pomada de uso externo impermeabilizan la piel y la protegen de los agentes externos. Si hay una cicatriz favorecen a la regeneración y tienen poder analgésico, Antioxidantes: Son capaces de captar radicales libres e inhibir la per oxidación lipídica.
- **Flavonoides (FL):** Los flavonoides están ampliamente distribuidos en las plantas; sobre todo en partes aéreas: hojas, flores y frutos; donde cumplen muchas funciones, entre ellas la producción de pigmentos de color amarillo en las flores y protección ante los ataques de microorganismos e insectos. La solubilidad depende de la forma en que se encuentran: aglicones libres o heterósidos. Aglicones son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos ya sean polares o apolares. Los heterósidos son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Son sustancias fácilmente oxidables. La quercetina es el más activo de los flavonoides, y muchas plantas medicinales deben gran parte de su actividad a su alto

contenido, la misma que ha demostrado una importante actividad antiinflamatoria debido a la inhibición directa de varios procesos iniciales de la inflamación. Sus principales acciones terapéuticas son: antihemorrágico, anti arrítmico, Protectores de la pared vascular o capilar, antiinflamatorios, antioxidante, antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, diuréticos, antiespasmódicos

- **Terpenos (TE):** Los terpenos son compuestos químicos aromáticos derivados del isopreno, compuesto de 5 carbonos con dobles enlaces conjugados. Su clasificación se determina por el número de isoprenos que contiene así: Monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), triterpenos (6 unidades) y politerpenos (más de 8 unidades). Dentro de los Monoterpenos existen algunos derivados de origen vegetal interesantes, como es el caso de los aceites esenciales que dan olor característico a muchas plantas, como es el caso del geraniol en el geranio. El aceite esencial es usado en aromaterapia, así como en medicina tradicional y alternativa.
- **Quinonas (QU):** Las quinonas son compuestos abundantes en la naturaleza, se encuentran en vegetales superiores, así como en hongos y bacterias. Tienen una estructura química aromática con dos grupos cetona, de acuerdo a su grado de complejidad pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas. Las antraquinonas se caracterizan por su poder laxante, ya que aumentan el peristaltismo intestinal, ejercen también un efecto colágeno y purgante, mientras que las naftoquinonas presentan una acción antiséptica.
- **Leucoantocianidinas (LE):** Las Leucoantocianidinas se consideran compuestos directamente relacionados con los flavonoides, son pigmentos que confieren coloraciones a numerosas flores, frutos y hojas. Con respecto a su acción terapéutica se caracteriza por tener actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiagregante plaquetario. (Lewtak et al., 2014)

1.4. Hialuronidasa (Ec 3.2.1.35)

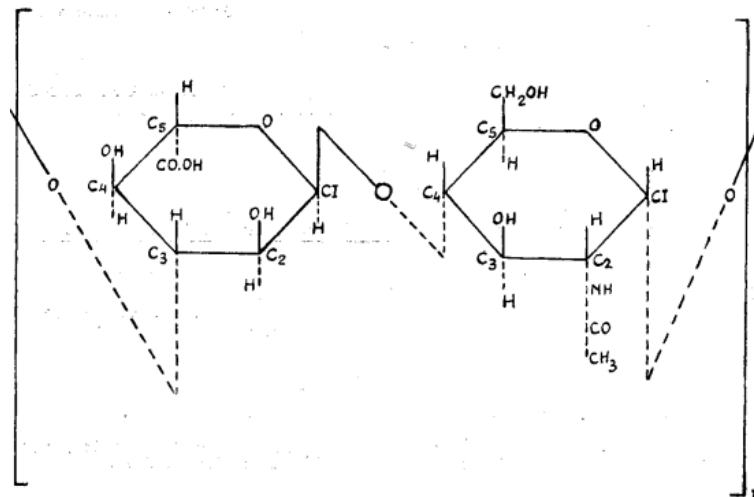
La hialuronidasa es una enzima proteica que modifica la permeabilidad del tejido conectivo mediante la hidrólisis del ácido hialurónico, este es un polisacárido de la sustancia intercelular del tejido conectivo y otros tejidos especializados, como el cordón umbilical o el humor vítreo. La

hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico, separando la unión entre el carbono en la posición uno (C1) de la molécula de la glucosamina y el carbono en la posición 4(C4) del ácido glucurónico. Esto disminuye temporalmente la viscosidad del cemento intracelular y nos brinda la difusión de los fluidos inyectados de los trasudados o exudados facilitando por este mecanismo su absorción. Esta enzima puede encontrarse de forma natural en diferentes sitios:

- En el acrosoma del espermatozoide, para la degradación de la corona radiada durante la fecundación.
- En bacterias patógenas (cápsulas de los estreptococos hemolíticos tipo A y C, estreptococo beta hemolítico, pneumococcus, staphylococcus, clostridiaproteus, flavobacteria, y Corynebacterium macnes), determinando su factor de virulencia al hidrolizar la matriz extracelular.
- En algunos tumores cutáneos malignos contiene 447 residuos aminoácidos y un peso de 61.000 daltons.
- En algunos países se utiliza otro tipo de hialuronidasa purificada, procedente de testículos bovinos (150 U/ml). Recientemente, la FDA aprobó (PrimaPharm Inc., San Diego, Calif. Hydase 150 units/mL) su uso para facilitar la dispersión y absorción de otros fármacos, incluidas sustancias radiopacas, y para la hipodermoclisis. que la secretan, favoreciendo su extensión e infiltración a tejidos adyacentes.
- En el veneno de la mayoría de las serpientes, abejas, avispas y escorpiones. (Sigall, 2011)

Dentro de los componentes que forman la matriz extracelular en tejidos de animales se encuentra el ácido hialurónico que posee alto peso molecular que al ser degradado por la enzima hialuronidasa se descompone en fragmentos de bajo peso molecular, rompiendo los enlaces. (Wang, H.J. et al. 2002. p. 22)

FIGURA N°1-1. Fórmula del ácido hialurónico



Fuente: Meyer, K.H. y Felling, J. 1950. p. 345

1.5. Veneno de Cobra (*Naja naja*)

Se conocen más de 300 especies de serpientes venenosas, entre las cuales podemos encontrar a la cobra de anteojos (*Naja naja*) perteneciente a la familia de las Elapidae, este tipo de familia posee un veneno con una potente y mortal neurotoxina, la cual actúa en la parálisis de los músculos y posterior paro cardiorespiratorio. Los componentes que encontramos en el veneno de cobra están formados por polipéptidos que incluyen toxinas, péptidos y unas 20 enzimas distintas como la hialuronidasa, estas generan lisis y aumentan la propagación del veneno de dicha serpiente en la presa. (Karalliedde, L. 1995. p. 74)

Existen dos tipos de mecanismos en el cuadro neurotóxico, uno es el presináptico que es producido por alfa-neurotoxinas y se caracterizan por el bloqueo de los canales de potasio de la porción terminal o por beta-neurotoxinas las cuales vacían las vesículas de acetilcolina, estas originan un estadio inicial, llegando a la parálisis facial, el bloqueo irreversible del receptor nicotínico formado por las alfa y k-neurotoxinas corresponde al postsináptico provocando la muerte del individuo. (Tsetlin, V., Hucho, F. 2004. p. 557)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Parte Experimental

2.1.1. Sitio De Investigación

Esta investigación se la realizo en el Laboratorio de Fitofarmacia y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en la Panamericana Sur, km 1 ½ correspondiente a la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo - Ecuador.

2.1.2. Materia Prima

La recolección de las plantas de Geranio Rojo(*Pelargoniumzonale*) se las realizó en la provincia de Chimborazo, ciudad Riobamba, parroquia rural Quimiag en el barrio Loma de Quito, con una temperatura constante de 12°C, de humedad 16. Posteriormente se realizó el secado de las plantas durante 6 días en un cuarto de la propiedad que esta ubicada en la parroquia Quimiag en donde se dispone de un techo con traga luz, seguido de su respectiva trituración en el laboratorio de Fitofarmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCHpara realizar los posteriores análisis para el estudio pertinente.

2.1.3. Materiales, reactivos y equipos

2.1.3.1. Materiales

- Espátula
- Gradillas
- Tubos de Ensayo
- Capsula de Porcelana

- Pinzas para Capsulas de Porcelana
- Balones aforados de 25ml, 50ml y 100ml
- Vasos de Precipitación de 50ml, 100ml, 250ml y 500ml.
- Equipo de Reflujo
- Balones esmerilados de 250ml y 500ml
- Embudo
- Embudo de separación
- Puntas para micropipetas
- Frascos de color ámbar
- Mascarilla
- Guantes
- Probeta 100ml
- Papel Aluminio
- Algodón
- Papel filtro
- Pinzas para tubos
- Pipetas Automáticas
- Reverbero

2.1.3.2. *Equipos*

- Estufa
- Mufla
- Bomba al vacío
- Sonicator
- Agitador
- Rotavapor
- Balanza Analítica
- pH-metro
- Centrifuga
- Triturador
- Espectrofotómetro UV Helios- β

2.1.3.3. *Reactivos*

- Metanol
- Agua Destilada
- Dimetilsulfóxido 5%
- Etanol
- Acetato de Etilo
- Cloruro de Calcio 12.5 mM
- Acetato de Sodio 0.1 M y 0.2 M
- Ácido Clorhídrico 10N y 1%
- Hidróxido de Sodio 0.4 M
- Borato de Sodio 0.2 M
- Ácido Acético 0.1 M y 0.2 M
- Cloruro de Sodio 0.9% 0.15 M
- p-dimetilaminobenzaldehído
- Hialuronidasa bovina
- Hialuronato de Sodio
- Ácido Hialurónico
- Veneno de Cobra
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Mayer
- Cloruro Férrico al 5%
- Magnesio Metálico
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Fehling
- Alcohol Amílico
- Anhidro Acético
- Cloruro de Sodio en polvo
- Solución de Ninhidrina 5%

2.2. Técnicas.

2.2.1. Control de calidad de la materia prima

2.2.1.1. Determinación de Humedad

Se realiza a través del método gravimétrico, este consiste en tomar 2g de muestra y se añade a la cápsula de porcelana debe estar tarada por 3 horas a 37°C, por consiguiente se procede a someter la muestra por 3 horas en la estufa a 105°C con el fin de eliminar el agua que se encuentra en la muestra. Luego se coloca en un desecador hasta que se enfríe la muestra para su posterior peso en la balanza analítica, obteniéndose un peso constante. (Miranda, Martha. 1992. p. 32)

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M2-M1)}{(M1-M)} \times 100$$

Dónde:

M2 = peso de la cápsula con la muestra

M1 = peso de la cápsula con la muestra desecada

M = peso de la cápsula vacía tarada

2.2.1.2. Determinación de cenizas totales

Se lo realiza mediante método gravimétrico, se toma 2g de la muestra y se coloca se un crisol tarado previamente, antes se somete a carbonizar la muestra permitiendo la eliminación de todo residuo orgánico, seguido se coloca en la mufla por 2 horas a una temperatura de 600°C, llegando a obtener un polvo de color blanquecino, se enfría transcurrido una vez que transcurra el tiempo esperado y se pesa hasta valor constante. (Miranda, Martha. 1992. p. 32)

Cálculo:

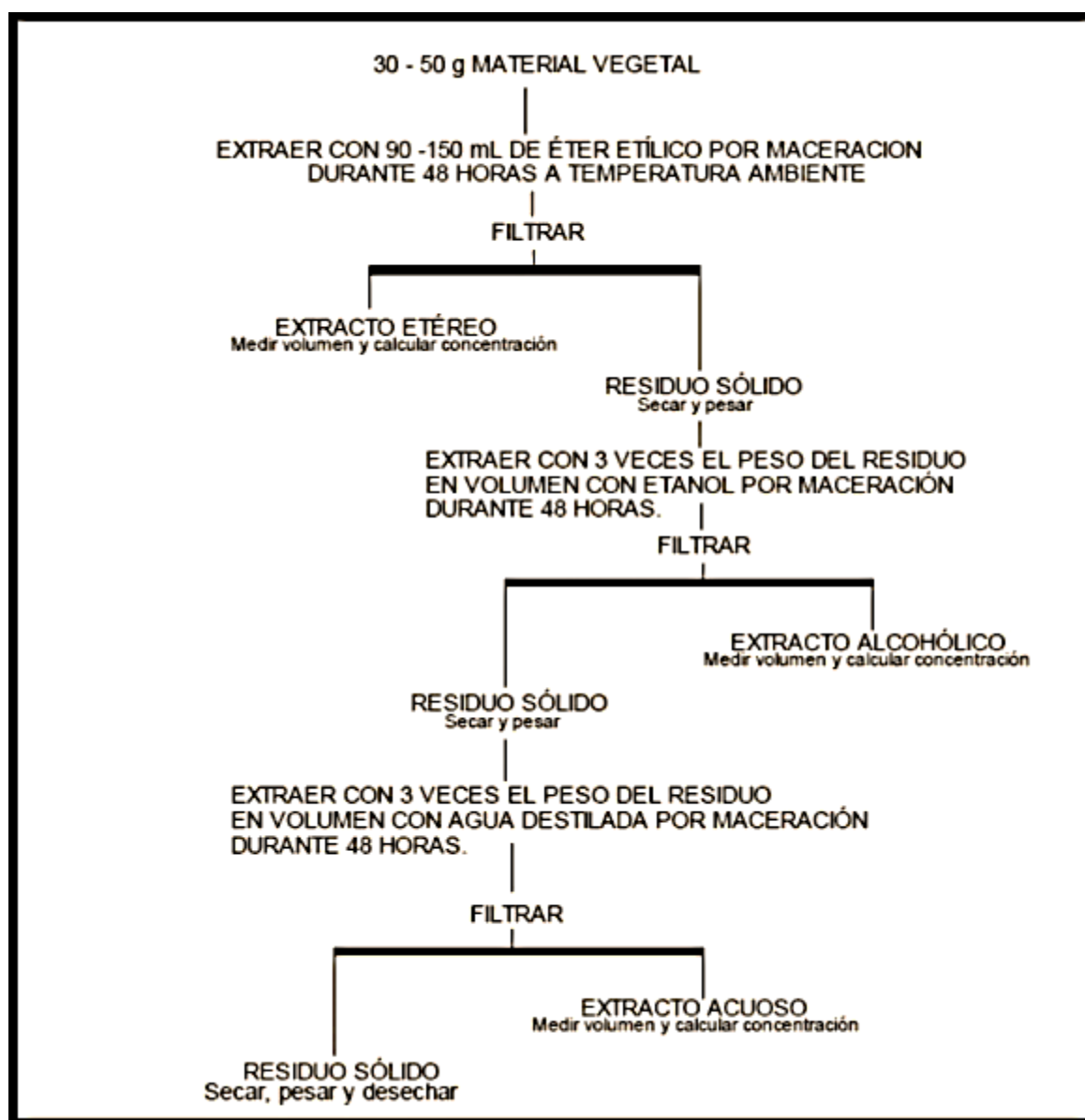
$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(M2-M1)}{(M1-M)} \times 100$$

Dónde:

M2 = peso del crisol con la ceniza
M1 = peso del crisol con la muestra
M = peso del crisol vacío

2.2.2. Ensayo Fitoquímico

FIGURA N°1-2. Diagrama de obtención de metabolitos secundarios.



Fuente: MIRANDA, M. Farmacognosia y productos naturales, 2011. p. 62

2.2.2.1. *Ensayo de Dragendorff*

Este ensayo sirve para evidenciar la presencia de alcaloides. La muestra una vez seca se procede a disolver en ácido clorhídrico 1%, se calienta paulatinamente y se enfría, a continuación se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se agita vigorosamente, los resultados pueden ser (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.2. *Ensayo de Mayer*

Al igual que el ensayo anterior nos sirve para observar la presencia de alcaloides, procede de igual manera se añade 1 gota de cloruro de sodio en polvo, a continuación se agita y se filtra, se agrega 3 gotas del reactivo en cuestión, e igual se observa: (+) opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.3. *Ensayo de Wagner*

Igual al método de Dragendorff, se añade 2 gotas del reactivo de Wagner y se observa el mismo reporte que los anteriores mencionados. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.4. *Ensayo de Lieberman- Buchard*

Se puede evidenciar la presencia de componentes de tipo terpenicos. La muestra es evaporada y se disuelve en cloroformo, seguido de la adición de 1mL de anhídrido acético para su posterior homogenización. Las coloraciones reportadas pueden ser: rosado- azul muy rápido, verde intenso- visible medio rápido, verde oscuro- negro, final de la reacción. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.5. *Ensayo de Baljet*

Este método sirve para determinar la presencia de componentes cumarínicos. Se seca la muestra y se disuelve en etanol, se añade 1mL del reactivo de Baljet y se reporta rojo si es positivo. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.6. *Ensayo de Sudán III*

A 1mL de la muestra se le agrega 1mL del reactivo de Sudán III, se somete a baño María hasta que el solvente se evapore. La presencia de gotitas grasas o una película roja indica componentes grasos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.7. *Ensayo de Borntrager*

Sirve para determinar la aparición de quinonas. La muestra se seca y se disuelve en 1mL de cloroformo, se añade 1mL de cal sodada al 5%, si el color cambia de rosado a rojo la reacción es positiva. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.8. *Ensayo de catequina*

En un capilar la muestra es llenada, se coloca una gota en papel filtro, y se añade carbonato de sodio, el color verde brillante indica que la reacción es positiva para determinación de catequina. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.9. *Ensayo de saponinas*

Se somete a dilución la muestra hasta cinco veces su volumen es decir si se toma 1mL del extracto se debería diluir 5mL con la dilución, se agita y se observa, la aparición de espuma por más de 2 minutos indica que la reacción es positiva. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.10. *Ensayo de cloruro férrico*

Se añade unas gotas de tricloruro férrico 5% a la muestra, el color rojo indica que existen componentes fenólicos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.2.11. *Ensayo de Shinoda*

1mL de ácido clorhídrico es añadido al extracto, se coloca cinta de magnesio, se espera un lapso de cinco minutos y se añade 1mL de alcohol amílico, se agita y reposa la muestra. En este ensayo se evidencia dos fases la una es alcohólica donde los colores pueden aparecer tanto amarillo, como naranja y rojo intenso, esta coloración es característicos de compuestos flavónicos. (Miranda, M. 2006. p. 39)

2.2.3. *Preparación de los extractos de Pelargonium zonale de hojas y flores.*

2.2.4. Determinación de la inhibición de hialuronidasa.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de la hialuronidasa se utilizarán dos estudios:

2.2.4.1. Inhibición de hialuronidasa

Para la medición de la cantidad de N-acetilglucosamina liberada del hialuronato de sodio se realizan los siguientes pasos:

- Tomar 50 uL de hialuronidasa bovina, la cual es disuelta en buffer acetato 0,1 M (pH=3.6).
- La solución es mezclada con 50 uL de los fracciones flavónicas en diferentes concentraciones de 0.005g/mL, 0.01g/mL y 0.02g/mL de cada tipo de especie vegetal disueltos en dimetilsulfóxido al 5%. El grupo control fue tratado con 50 uL al 5% de dimetilsulfóxido. Esta mezcla se somete a incubación a por 20 minutos a 37°C, transcurrido ese tiempo luego se agrega 50 uL de cloruro de calcio (12,5 mM) para activar la enzima y se deja incubar por 20 minutos más a la misma temperatura.
- Al término del tiempo se agrega 250 uL de hialuronato de sodio (1,2 mg/mL) y se incuba durante 40 minutos más a 37°C. Luego de la incubación la mezcla es tratada con 50 uL de NaOH 0,4 M y de 100 uL 0.2M de borato de sodio, sometida la mezcla por 3 minutos en un baño de agua hirviendo, se deja enfriar y posteriormente se agrega 1,5 mL de p-dimetilaminobenzaldehido (4g de p-dimetilaminobenzaldehido fueron disueltos en 50 mL de HCl 10N con 350 mL de ácido acético glacial) y se incuba por 20 minutos a 37°C hasta desarrollar color. La absorbancia es medida a 585 nm en un espectrofotómetro, midiendo la cantidad de N-acetilglucosamina liberada (Shasrabudhe, A., Deodhar, M. 2010. p. 299)

Expresándose este efector inhibidor de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{O.D.\text{control} - O.D.\text{muestra}}{O.D.\text{control}} \right) \times 100$$

TABLA N°1-2. Esquema de tratamientos de acuerdo a cada parte de la especie vegetal para la inhibición de hialuronidasa.

TRATAMIENTOS	REACTIVOS					
--------------	-----------	--	--	--	--	--

	Buffer pH: 3.6	Hialuronidas a	CaCl ₂ 12.5 mM	Hialuron ato de Sodio	NaOH 0.4 M y <i>Na₂B₄O₇</i> 0.2 M	p- DMA B
BLANCO	X		X		X	X
CONTROL MAXIMA ACTIVIDAD		X	X	X	X	X
HOJAS <i>Pelargoniumzonale</i> (0.005g/ml)		X	X	X	X	X
HOJAS <i>Pelargoniumzonale</i> (0.01g/ml)		X	X	X	X	X
HOJAS <i>Pelargoniumzonale</i> (0.02g/ml)		X	X	X	X	X
FLORES <i>Pelargoniumzonale</i> (0.005g/ml)		X	X	X	X	X
FLORES <i>Pelargoniumzonale</i> (0.01g/ml)		X	X	X	X	X
FLORES <i>Pelargoniumzonale</i> (0.02g/ml)		X	X	X	X	X

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

2.2.4.2. Veneno de Cobra (*Naja naja*)

- 100 ug de veneno de cobra fueron disueltos en 20 uL de solución salina e incubado a 37°C con 50 ug de ácido hialurónico en 250 uL (0.2 M) disuelta en buffer acetato (pH 5.0) contenidos en 0.15 N de cloruro de sodio. La absorbancia de dicha mezcla fue medida a 585 nm.
- Las fracciones flavónicas de cada tipo de planta han sido disueltas como en la técnica anterior, es decir en dimetilsulfóxido al 5%, para su posterior ensayo. La actividad es expresada como n moles de N-acetylglucosamina liberada/minuto/mg de proteína. (Machiad, D. et al. 2006. p. 158)

TABLA N°2-2. Esquema de tratamientos de acuerdo a cada parte de la especie vegetal en la inhibición del veneno de cobra (Naja naja).

TRATAMIENTOS	REACTIVOS		
	Buffer: pH: 5	Veneno de Cobra	Ácido Hialurónico
BLANCO	X		
CONTROL MAXIMA ACTIVIDAD		X	X
HOJAS Pelargoniumzonale (0.005g/ml)		X	X
HOJAS Pelargoniumzonale (0.01g/ml)		X	X
HOJAS Pelargoniumzonale (0.02g/ml)		X	X
FLORES Pelargoniumzonale (0.005g/ml)		X	X
FLORES Pelargoniumzonale (0.01g/ml)		X	X
FLORES Pelargoniumzonale (0.02g/ml)		X	X

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Resultados y Discusiones.

3.1.1. Control de Calidad de la Materia Prima.

Se tomó como referencia la Guía de Farmacognosia y Productos Naturales y en base a las Normas Ramales para Drogas crudas, extractos y tinturas. (NRSP 309, 311 y 312) para la obtención de los extractos a investigar. Tomando en cuenta las determinadas antes ya descritas. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

TABLA N° 1-3. Control de calidad de laplanta investigada.

ENSAYOS	<i>Pelargonium zonale</i> (hojas)	<i>Pelargonium zonale</i> (flores)	Limite a aceptar (Farmacopea Española 2002)
CENIZAS (%)	4 %	4.5 %	5 %
HUMEDAD (%)	11 %	13.4 %	14 %

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

En la Tabla N° 1-3 podemos observar que el porcentaje de humedad para *Pelargoniumzonale* (hojas) fue el de 11% y para *Pelargoniumzonale* (flores) fue de 13.4%, valores que se encuentran dentro de lo establecido o normado por la Real Farmacopea Española (2002). También podemos evidenciar que el porcentaje de cenizas totales fue de 4% y 4.5% correspondiente a hojas y flores respectivamente, datos acorde a los establecido por el ente regulador.

A todo ello, podemos decir que los valores tanto de humedad como los de cenizas totales obtenidos en los diferentes análisis de las diferentes plantas se encuentran dentro de los límites permitidos, presentando proporciones relativamente bajas en lo referente a minerales, los cuales no producirían impedimento en la preparación de los extractos a obtener. (Brunenton, J. 2001. p. 59)

3.1.2. Tamizaje Fitoquímico.

Tomando como referencia la bibliografía (Miranda, M. 2006. p. 39) se realizó el análisis fitoquímico. Los resultados alcanzados fueron los siguientes:

TABLA N°2-3. Tamizaje Fitoquímico de los extractos de *Pelargonium zonale* de hojas y flores.

<i>Pelargonium zonale</i>			
Ensayo	Compuesto	Hojas	Flores
Dragendorff	Alcaloides	++	+
Mayer	Alcaloides	++	++
Wagner	Alcaloides	++	+
Baljet	Cumarinas	-	-
Borntrager	Quinonas	-	+++
Lieberman-Buchard	Terpenos	+	+
Fehling	Azúcares reductores	+	+
Resinas	Resinas	-	-
Espuma	Saponinas	+++	++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+	+
Shinoda	Flavonoides	++	+++
Antocianidina	Antocianidinas	+	++
Catequinas	Catequinas	+	+

Dónde: (+) opalescencia, (++) turbidez definida), (+++) precipitado

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

En la Tabla N° 2-3 se puede observar claramente que los compuestos secundarios en mayor cantidad son: quinonas, catequinas, antocianidinas, componentes fenólicos, flavonoides, en ambas especies vegetales, hecho que da a entender el posible efecto inhibitorio de la hialuronidasa y veneno de cobra, por parte de estas sustancias de carácter fenólico. (Timor, C. 1991. p. 63) Es así

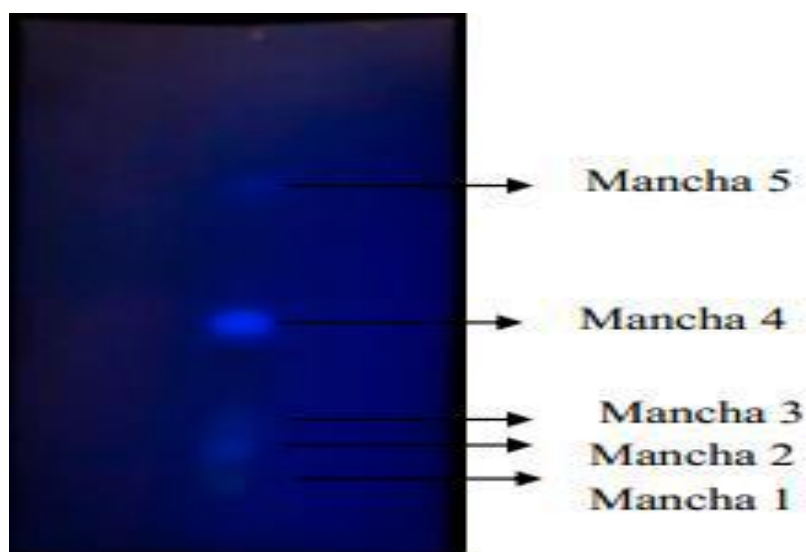
que al encontrarse en su mayoría compuestos flavónicos, la presente investigación se la realiza con este tipo de componentes.

3.1.3. Cromatografía en Capa Fina.

3.1.3.1. Cromatografías del extracto de *Pelargoniumzonale*.

Se realizaron los respectivos ensayos de cromatografías utilizando los siguientes solventes, tolueno: acetato de etilo (93:7), tolueno: acetato de etilo (80:20), tolueno: acetato de etilo (70:30), y finalmente con tolueno: acetato de etilo (60:40), este último ensayo es donde se evidencia cinco manchas visibles a la luz ultravioleta.

FIGURA N°. 1-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de P.z. Fase Móvil: tolueno: acetato de etilo forma progresiva (93:7)-(80:20)-(70:30)-(60-40).



Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

CUADRO N°1-3. Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina del *Pelargoniumzonale*(hojas).

COMPONENTE	Rf
Mancha 1	0.05
Mancha 2	0.12
Mancha 3	0.47
Mancha 4	0.80
Mancha 4	0.83

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

3.1.3.2. Cromatografías del extracto de *Pelargoniumzonale* (flores)

Se utilizaron los siguientes solventes: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26). Posteriormente, se obtuvieron cuatro manchas las cuales fueron visibles a la luz ultravioleta.

FIGURA N°2-3. Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *Pelargoniumzonale* (flores). Fase Móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26)



Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

CUADRO N°2-3. Rf de los compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de *Pelargoniumzonale* (flores)

COMPONENTE	Rf
Mancha 1	0.25
Mancha 2	0.35
Mancha 3	0.80
Mancha 4	0.90

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

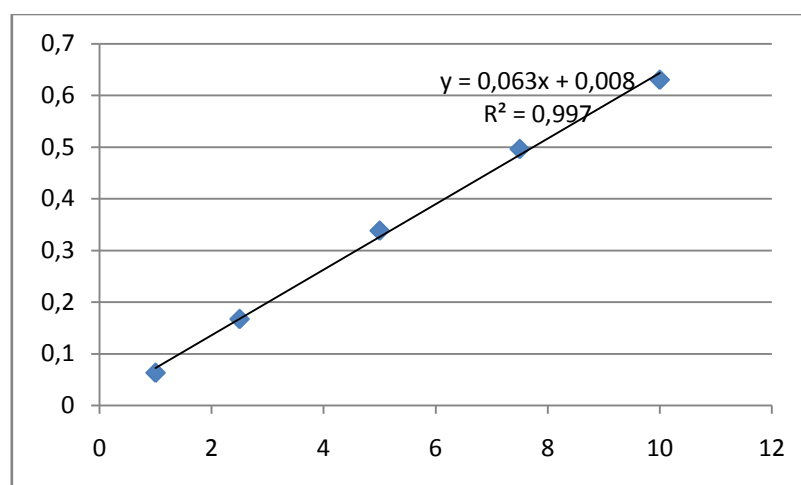
3.1.4. Cuantificación de Flavonoides Totales.

Se utilizó como estándar quercetina, para cuantificar los flavonoides totales presentes en las especies vegetales a investigar, donde se elaboró una curva de calibración con dicho estándar a distintas concentraciones, por consiguiente se calculó la concentración de flavonoides totales mediante la ecuación de la curva tomando como referencia las absorbancias medidas en el

espectrofotómetro ultravioleta a 377nm para la planta a analizar, detallándose a continuación la curva de calibración:

FIGURA N°3-3. Curva de calibración de quercetina.

Concentración (ug/ml)	Absorbancia
1	0,063
2,5	0,167
5	0,338
7,5	0,496
10	0,63



Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

En esta gráfica podemos evidenciar una vez interpolado los resultados de las diferentes plantas, es decir sus absorbancias en referencia al estándar que para el *Pelargoniumzonale* (hojas) se obtuvo una concentración de 0,2mg/g de droga y 0,15mg/g de droga correspondiente a la misma planta en flores. Este hecho demuestra que para cada parte de la especie vegetal analizada la cantidad de flavonoides presentes es realmente significativa.

3.1.5. Análisis del Protocolo de inhibición de la Hialuronidasa.

TABLA N° 3-3. Porcentaje de inhibición de hialuronidasa de los extractos metanólicos de *Pelargoniumzonale* de hojas y flores.

PLANTA	PARTE USADA	[] (g/ml)	% inhibición
<i>Pelargoniumzonale</i>	Flores	0.005	41.30
		0.01	50
		0.02	83
<i>Pelargoniumzonale</i>	Hojas	0.005	26.3
		0.01	35.5
		0.02	59.8

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

En la Tabla N° 3-3 podemos observar que en los diferentes tratamientos aplicados con los extractos de *Pelargoniumzonale* (flores) presentaron una actividad sumamente interesante en la inhibición de hialuronidasa, obteniendo un 82.5% en la dosis de 0.02 g/ml de fracción flavónica, esto quiere decir que a mayor dosis mejor efecto inhibitorio. En el caso de las hojas también se obtuvo buenos resultados 59.8% pero un poco por debajo de los extractos en flores pero también tiene un porcentaje de inhibición considerable, Con esto queremos decir que la planta en si cumple el efecto inhibitorio esperado.

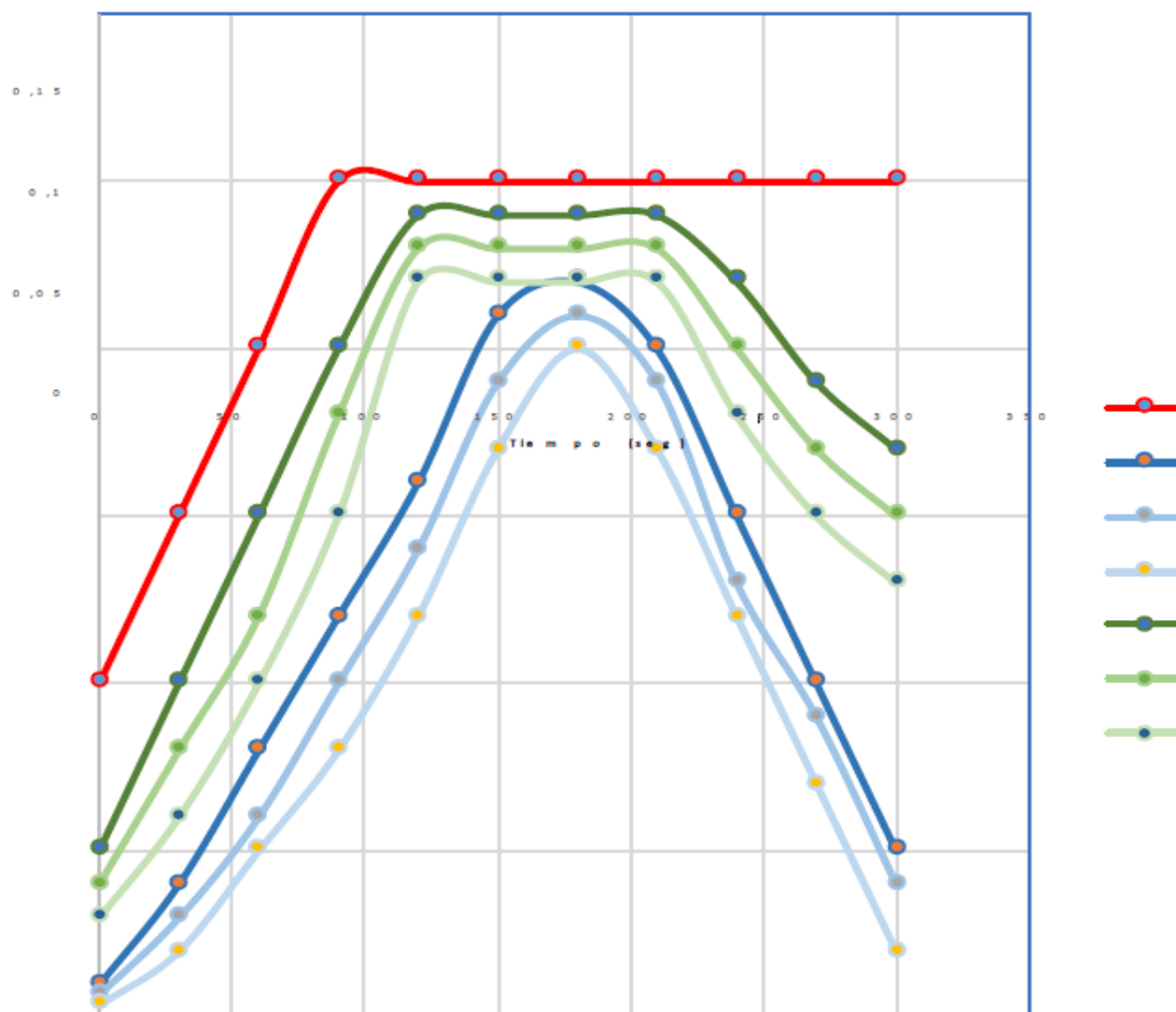
TABLA N° 4-3. Efecto de los extractos metanólicos de *Pelargoniumzonale* en hojas y flores en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra.

		<i>Pelargoniumzonale</i> (flores)			<i>Pelargoniumzonale</i> (hojas)		
TIEMPO (seg)	MAXIMA ACTIVIDAD	0.005 g/ml	0.01 g/ml	0.02 g/ml	0.005 g/ml	0.01 g/ml	0.02 g/ml
0	0.1	0.01	0.007	0.03	0.032	0.031	0.03
30	0.15	0.04	0.03	0.03	0.032	0.031	0.03
60	0.2	0.08	0.06	0.03	0.032	0.031	0.03
90	0.25	0.12	0.1	0.03	0.032	0.031	0.03
120	0.25	0.16	0.14	0.031	0.032	0.032	0.031
150	0.25	0.21	0.19	0.031	0.033	0.032	0.031
180	0.25	0.22	0.21	0.031	0.033	0.032	0.031
210	0.25	0.2	0.19	0.031	0.033	0.032	0.031
240	0.25	0.15	0.13	0.029	0.033	0.032	0.031

270	0.25	0.1	0.09	0.029	0.033	0.032	0.03
300	0.25	0.05	0.04	0.029	0.032	0.032	0.03

Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

FIGURA N°4-3. Curva de Calibración de la actividad de los extractos metanólicos de *Pelargoniumzonale* hojas y flores en la inhibición de hialuronidasa del veneno de cobra (*Naja naja*).



Fuente: ANDRADE.Carlos.2015

MAXIMA ACTIVIDAD:

0.005 g/ml P.z (Flores)

0.01 g/ml P.z (Flores)

0.02 g/ml P.z (Flores)

0.005 g/ml P.z (Hojas)

0.01 g/ml P.z (Hojas)

0.02 g/ml P.z (Hojas)

De acuerdo a la Figura N°4-3. Los extractos de *Pelargoniumzonale* de flores presentan mejores resultados en cuanto a los tratamientos de *Pelargoniumzonale* hojas, la fracción flavónica del extracto de flores a la dosis de 0.005g/mL permite una excelente inhibición de la hialuronidasa encontrada en dicho veneno, sin descartar las demás dosis utilizadas en esta investigación siendo aceptables, esto quiere decir que a dosis bajas hay mayor inhibición de veneno de cobra. Ocurre de igual manera con los demás tratamientos de *Pelargoniumzonale* (hojas), que también al bajar sus dosis se obtendrá también un buen efecto inhibitorio. La mezcla del veneno de cobra con el ácido hialurónico produce una turbidez, precipitación o floculación del medio, una vez que los extractos actúan sobre dicha mezcla estos no permiten que la reacción progrese sino que en cambio disminuya, donde los componentes flavónicos estarían interviniendo en dicho procedimiento. (Bricskorn, Ch. et al. 1979. p. 90)

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los diferentes extractos metanólicos de *Pelargonium zonale* de flores y hojas, utilizando el método de reflujo por soxhlej y reflujo, donde estos fueron sometidos a separación de componentes fenólicos, la coloración de tono rojo y amarillo de los extractos respectivamente, evidencia la presencia de compuestos fenólicos.
- Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de la especie vegetal, cuya determinación permitió darnos cuenta que existía componentes de tipo fenólico, como flavonoides y antocianinas, interesándonos más en los flavonoides.
- Se comprobó la actividad inhibitoria de los extractos de *Pelargonium zonale* Flores en la hialuronidasa, siendo la dosis de 0.02g/ml de fracción flavónica la más óptima en este tipo de investigación ya que resultó directamente proporcional la relación, a mayor concentración mayor inhibición.
- Se determinó el efecto inhibitorio de los extractos de *Pelargonium zonale* en flores y hojas en la enzima hialuronidasa encontrada en el veneno de cobra, donde a ambas especies vegetales se les atribuye una excelente actividad inhibitoria, cabe destacar que el mejor tratamiento fue el del extracto de flores de dicha planta en la dosis de 0.02g/mL.
- Mediante esta investigación se puede concluir que los extractos de *Pelargonium zonale* en especial el de flores posee actividad inhibitoria y por ende un mejor efecto cicatrizante en pacientes con heridas que padezcan diabetes.

RECOMENDACIONES

- De acuerdo al presente trabajo los extractos de *Pelargonium zonale* (hojas) referente al método de inhibición de la enzima hialuronidasa, no presenta dicha inhibición o la presente demasiado poco, como recomendación para futuras investigaciones, sería la de utilizar un métodos de separación de componentes de fase sólida, descartando así las interferencias.
- Sería aconsejable realizar una formulación de tecnológica farmacéutica, que permita una fácil adquisición para aquellos pacientes diabéticos.
- Se recomienda seguir con la investigación, referente a un método más completo acerca de la purificación de los metabolitos secundarios, las cuales son sustancias encargadas explícitamente de la actividad biológica.
- Cuando existe un mayor % de flavonoides que están presentes en los extractos metanólicos, no se usa derivatización ya que estos miden absorbancias por poseer características colorimétricas, se puede utilizar métodos inmunoquímicos, electroquímico.
- Seguir con la investigación en la elaboración de una fórmula magistral para la aplicación en pacientes con heridas de difícil cicatrización producida por la diabetes o en casos más fuertes pacientes con pie diabético.

BIBLIOGRAFIA.

1. **AKERELE, O.** *The WHO traditional medicine program: policy and implementation. Int. Trad. Med. Newslett. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas.* [en línea], 2009, (Brasil) 1, pp. 1-3. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S037818442005000800005&script=sci_arttext
2. **ARAGADVAY, S.** *Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Baccharis latifolia) y hierbamora (Solanumnigrum).* (TESIS-pregrado) (Bioquímica Farmacéutica). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Ecuador. 2009, pp. 65-69. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56t00190.pdf>
3. **ARMSTRONG, D., LAVERY, L., KIMBRIEL, H., NIXON, B., BOULTON, A.** *Activity patterns of patients with diabetic foot ulceration: patients with active ulceration may not adhere to a standard pressure off-loading regimen. Diabetes Care.* [en línea], 2003, (Chicago) 26, pp. 2595-2597. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://care.diabetesjournals.org/content/27/8/1980.full>
4. **ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE LA DIABETES (ALAD).** *Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.* [en línea], 2008, Washington: Pablo Aschner, MD, MSc, p. 4. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.alad-latinoamerica.org/phocadownload/guias%20alad.pdf>
5. **BALKAN, B.** *Hyperinsulinemia and glucose tolerance in obese raton food.* Illinois-Estados Unidos, Editorial Universitaria, 1991, pp. 40-50.
6. **BLACPMA.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* [en línea], 2007, (Argentina) 6 (5), pp. 144-304. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en:

http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/old%20blacpma%20archive/BLACPMA_V6_N5.pdf

7. **BOYKO, E.J., AHRONI, J.H. et al.** *A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. The Seattle DiabeticFootStudy. Diabetes Care.* [en línea], 1999, (USA) 22 (7), pp 1036-42.[Consulta: 02 de Enero 2015]. Disponible en:
8. **BREM, H., SHEEHAN, P., BOULTON, A.J.** *Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. Am J Surg.* [en línea], 2004, (USA) 187 (5A): 1S-10S Review, p. 5. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147985>
9. **BRIESKORN, C.H., RIEDEL, W.** *Triterpene acids from coleus amboinicus toureiro. ArchPharm.* [en línea], 1977, (India) 310 (11), p. 910-16. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf
10. **BRUNETON, J.** *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas medicinales.* Zaragoza-España. Editorial Acribia. 2ª edición, 2001, pp. 59-60.
11. **CLARK, R.A.F.** *Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. J Invest Dermatol:Suppl. Department of Dermatology and Medicine, University of Colorado School of Medicine and National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, Colorado.* [en línea], 1990, (U.S.A.) 94, pp. 128S-134S. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/jid/journal/v94/n6s/pdf/5612946a.pdf>
12. **FIGUEROLA, D.** *Diabetes mellitus;* 13va ed. Madrid-España, Editoriales HarcourtBrace, 2009, pp. 1933-1969.

13. **FOLKMAN, J.** *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview*. [en línea], 1997, (Francia), pp. 79:1-8. [Consulta: 02 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002217>
14. **GABBIANI, G., CHAPONNIER, C., HUTTNER, I.** *Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing*. *J Cell Biol*[en línea], 1978, (Reino Unido) 76, pp. 561-568. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515361/>
15. **GARCIA LUDEÑA, J.L.** *La hialuronidasa estudio farmacológico. Experimental y aplicaciones. Terapéuticas. Antecedentes -Resumen histórico. Anales de Medicina y cirugía*. [en línea], 1958, (USA) Vol. XXXVIII, p. 348. [Consulta: 05 Enero 2015].Disponible en: <http://www.raco.cat/index.php/AnalesMedicina/article/download/169773/254314>
16. **GUYTON, A.** *Fisiología humana*. México, Editorial Interamericana, 1974, pp. 156-158.
17. **INEC**, *La diabetes es la segunda causa de muerte general en el país*. [en línea], Quito–Ecuador, 2013. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://ecuadorencifras.com>
18. **KAKEGAWA, H., MATSUMOTO, H., ENDO, K., SATOH, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I.** *Inhibitory effects of Tannis on Hialuronidase Activation and on Degranulation from Mesentery Mast Cells*. *Chem. Pharm. Bull.* [en línea], 1985, (Tokyo) 33, pp. 5079-5081. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en:

http://www.uv.es/prietojm/Old%20Blacpma/old%20blacpma%20archive/BLACPMA_V3_N4.pdf

19. **KARALLIEDDE, L.** *Animal toxins. British Journal of Anaesthesia.* [en línea], 1995, (London) 74, pp. 319-327. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.biosciweb.net/animal/pdf/animal%20toxins.pdf>
20. **KIRSNER, R., EAGLSTEIN, W.** *El proceso de curación de las heridas. Clínicas Dermatológicas.* Madrid, Editorial Interamericana, 1993, pp. 653-662.
21. **LARJAVA, H., SALO, T., HAAPASALMI, K., KRAMER, R.H., HEINO, J.** *Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. J ClinInvest*[en línea], 1993, (New York) 92, pp. 1425-1435. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132537/>
22. **MACHESNEY, M.I., TIDMAN, N., WASEEM, A., KIRBY, L., LEIGH, I.** *Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. Am J Pathol.* [en línea], 1998, (U.S.A.) 152 (5), pp. 1133-41. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588880>
23. **MACHIAH, D.K., GIRISH, K.S., GOWDA, T.V.,** *A glycoprotein from a folk medicinal plant, Withaniasomnifera, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* [en línea], 2006, (India) 143, pp. 158–161. [Consulta: 11 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.amazon.com/glycoprotein-medicinal-Withania-somnifera-hyaluronidase/dp/B000RR8FWQ>

24. **MALAY, D.S., MARGOLIS, D.J., HOFFSTAD, O.J., BELLAMY, S.** *The incidence and risks of failure to heal after lower extremity amputation for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcer. J Foot Ankle Surg. Center for Clinical Epidemiology and Biostatistics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA* [en línea], 2006. (U.S.A.) 45, pp. 366-74. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: [http://www.jfas.org/article/S1067-2516\(06\)00443-1/fulltext](http://www.jfas.org/article/S1067-2516(06)00443-1/fulltext)
25. **MENENDEZ, Rosa., GONZÁLEZ, Vania.** *Plectranthusamboinicus (Lour) Spreng Revista Cubana. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Artículo de revisión.* [en línea], 1999, (Cuba) 3 (3), pp. 110-15. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf
26. **MIRANDA, Martha.** *Farmacognosia y productos naturales. Normas ramales de drogas crudas y extractos y tinturas.* Cuba. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP. 1992, pp 32-62
27. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA.** *Boletín del Día Mundial de la diabetes.* Ecuador. [en línea], Ecuador: MSP, 2013. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/dia-mundial-de-la-diabetes-msp-ejecuta-acciones-para-reducir-su-incidencia-y-complicaciones/>
28. **PAZMIÑO, Carlos.** *Determinación de la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de Justicia chlorostachya Leonard (insulina), en ratones con hiperglucemia inducida.* (TESIS-pregrado) (Bioquímico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba - Ecuador. 2011, pp 25-26. [Consulta: 06 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1990/1/56T00298.pdf>
29. **PORETSKY, L.** *Principal of Diabetes Mellitus.* 2da ed, New York-USA, Editorial Medical ED, 2008, pp 378- 73.

30. **PRIETO, S., GONZÁLEZ, J.A., MOLINA, J., DIEGUEZ, R., GARRIDO, G., GAMIOTEA, D., et al.** *Contribución a una terapéutica natural en el tratamiento antiviral. RevLatinoam Quím. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica.* [en línea], 2000. (Cuba) 28, p. 108. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152003000300006&script=sci_arttext
31. **SHASRABUDHE, A., DEODHAR, M.** *Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of Garcinia indica. International Journal of Botany.* [en línea], 2010. (China) 6, pp. 299–303. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://scialert.net/fulltext/?doi=ijb.2010.299.303&org=11>
32. **SINGER, A.J., CLARK, R.A.** *Cutaneous Wound Healing. N. Eng. J. Med.* [en línea], 1999, (England) 341, pp.738–746. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461>
33. **SHAH, M., FOREMAN, D.M.** *Neutralization of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. J Cell Sci Cells, Immunology and Development Division, School of Biological Sciences, University of Manchester, UK.* [en línea], 1995, (Uckania) 108 (3), pp. 985-1002. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461>
34. **STANLEY, J.** *Anatomía y fisiología humana.* México, Editorial Interamericana, 1976, p. 409.
35. **STOJANONSKA, L.** *Evolution of dexamethasone – induced insulin Resistant in rat; Oklahoma-USA, Editorial Omega, 2005, pp.748-56.*

36. **TAMAYO, M.** *Influencia de un tratamiento integral de pie diabético en la disminución del índice de amputaciones de los pacientes atendidos en la unidad de pie diabético del hospital provincial general docente Riobamba, durante el período enero– septiembre de 2013*”. (TESIS-pregrado) (Médico). Universidad Técnica de Ambato.Facultad de Salud. Escuela de Medicina Ambato, Ecuador, 2014, p. 25. [Consulta: 06 Enero 2015]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6595/1/Mar%C3%ADDa%20Alexandra%20Tamayo%20Freire.pdf>
37. **TIMOR, C.** *Evaluación físico-química del aceite esencial de las hojas de *Plectranthusamboinicus* (Lour) Spreng.* *Revista Cubana Farmacéutica*. [en línea], 1991, (Cuba) 25 (1), pp. 63-6 [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla06399.pdf
38. **TSETLIN, V.I., HUCHO, F.** *Snake and snail toxins actino on nicotinic actylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications*. [en línea], 2003, (Rusia), p. 557. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303014546>
39. **TOOLE, B.P.** *Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation*. In: *Hay ED, ed. Cell biology of extracellular matrix. Plenum Press*. [en línea], 2001, (U.S.A.), pp. 305-341. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/ja/journal/v59/n12/abs/ja2006101a.html>
40. **VAALAMO, M., MATTILA, L., JOHANSSON, N., KARINIEMI, A.L., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L., KÄHÄRI, V.M. et al.** *Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds*. *J InvestDermatol*. [en línea], 2001. (Finlandia), 109, pp. 96-101. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/jid/journal/v129/n11/full/jid2009298a.html>

41. **WANG, H.J., PAUL, I.C., ZELNIK, R., MIKUTA, K., LAVIC, D.** *Structure and absolute stereochemistry of the tetracyclic compound plectranthosin. J Amer Chem Soc. Evaluación físico-química del aceite esencial de las hojas de Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng. Revista Cubana Farmacéutica.* [en línea], 1973, (Cuba) 78 (558/600), pp. 8555-69 [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_3_99/pla399.pdf
42. **XU, J., CLARK, R.A.F.** *Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. J Cell Biol* [en línea], 1996, (U.S.A.) 132, pp. 239-249. [Consulta: 08 Enero 2015]. Disponible en: <http://jcb.rupress.org/content/132/1/239.abstract>

ANEXOS

Anexo A. Análisis de Humedad



Fotografía N°1. Peso del crisol**Fotografía N°2.** Peso del crisol con la muestra

Anexo B. Obtención de los extractos de la planta



Fotografía N°3. Método de extracción por soxhlet



Fotografía N°4. Concentración en Rotavapor de los extractos de la planta

Anexo C. Inhibición de hialuronidasa



Fotografía N°5. Blancos



Fotografía N°6. Reactivos

Anexo D. Determinación de absorbancias de los diferentes tratamientos



Fotografía N°7. Medición de absorbancias

